

УДК 620.186:547.447

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ ПОКРЫТИЯ ТКАНИ ПЕРИКАРДА ИОНОГЕННЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ХИТОЗАНА МЕТОДАМИ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2009 г. А. И. Гамзазаде¹, Н. П. Бакулева², Е. М. Белавцева¹, М. О. Галлямов³

E-mail: whitewolf2@ineos.as.ru

Исследована морфология покрытия ткани перикарда ионогенными производными хитозана методами сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии. Показано, что на поверхности перикарда образуется сплошное полимерное покрытие с толщиной двойного слоя примерно 3.5 мкм. Найдено также, что при этом заметно улучшается смачиваемость поверхности модифицированного перикарда.

Метод электронной микроскопии – неоценимый инструмент для морфологического контроля строения и свойств природных соединений, а также материалов и изделий на их основе [1].

Один из перспективных биоматериалов для медицинских целей – перикард телянка: соединительная ткань, состоящая из разнообразных клеточных элементов и волокнистых структур, находящихся в полисахаридном геле. Благодаря нативным свойствам этих структур, обеспечиваются прочность и эластичность перикарда, поэтому изучение морфологии и структуры при модификации перикарда методами электронной микроскопии приобретает важное значение [2, 3].

Биологическая ткань из перикарда телянка после химической консервации применяется для изготовления биопротезов клапанов сердца и сосудов, однако при этом одновременно с усилением прочностных характеристик повышается гидрофобность биоткани, что приводит к снижению биосовместимости биопротезов на ее основе [4, 5].

Для улучшения физико-химических и биологических свойств используются производные хитозана, обладающие антимикробными, антикоагулянтными, а также пленкообразующими и гидрофильными свойствами [6, 7].

Настоящая работа посвящена исследованию морфологии и гидрофильности исходной и модифицированной биоткани, для чего последнюю обрабатывают последовательно растворами противополюжно заряженных производных хитозана с образованием на ее поверхности бислойного покрытия из комплексных частиц [8].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила стабилизированная биоткань из перикарда телянка, представляющего собой сшитую глутаровым альдегидом пластину из фибрилл коллагена, эластина и полиглюкозаминогликана в основном гиалуроновой кислоты.

Для модификации биоткани использовали водные растворы медьсодержащего хитозана (Cu-хитозана) и N-сульфосукцинилхитозана (ССХ), которые предварительно фильтровали через микрофильтр фирмы “Миллипор” с размером пор 0.22 мкм.

Исследование структуры покрытий пластин модифицированного перикарда проводили методами сканирующей (СЭМ) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на электронных микроскопах Hitachi S-405A, Hitachi S-570 и JSM-5300 (JEOL, Япония).

Для исследования особенностей скелета перикарда использован также метод СЭМ детергентно экстрагированных препаратов (ДЭП), который включал отмывку перикарда гепаринизированной средой 199 в течение 30 с, затем в течение 5 мин 1%-ным раствором тритона X-100 в буфере, содержащем 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 5 mM имидазола, 4 mM глицерина с pH 6.8. Далее проводилась дополнительная фиксация в 2.5%-ном растворе глутарового альдегида (ГА) на том же буфере в течение 2 мин, а затем в 2.5%-ном растворе ГА на среде 199 в течение 5 мин.

Препараты для СЭМ и ПЭМ готовили фиксацией в 2.5%-ном растворе глутарового альдегида (ГА) в среде 199 в течение 24 ч, далее фрагменты перикарда отмывали 10 мин в буфере Миллонига, 1 ч выдерживали в фиксаторе Миллонига, промывали в среде 199, инкубировали с 1%-ным раствором танниновой кислоты в течение 50 мин и трижды промывали 1%-ным раствором сульфата на-

¹ Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва.

² Научный центр сердечно-сосудистой хирургии А.Н. Бакулева РАМН, Москва.

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова.

трия. Затем образцы обезживали, обрабатывая растворами этанола увеличивающейся концентрации и абсолютным ацетоном, и закладывали в аралдит для приготовления поперечных срезов либо высушивали путем перехода через критическую точку CO_2 в установке НСР-2 (Hitachi, Япония) для оценки рельефа поверхности.

После полимеризации готовили тонкие срезы (1–2 мкм), которые окрашивали метиленовым синим. Прицельно заточенные блоки получали на ультратоме LKB-111. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в просвечивающем электронном микроскопе ЭВМ-100 АК (ПЭМ). Все препараты обрабатывали 1%-ным раствором OsO_4 .

Высушенные образцы для оценки рельефа поверхности напыляли слоем золота толщиной 10 нм в аппарате “Elico 111” или вакуумной установке JVC-140E.

Процессы смачивания изучали с помощью стандартизированной методики регистрации динамики изменения формы адсорбированной капли, подробно описанной в [9]. Вкратце эта методика состояла в помещении капли эталонной жидкости на поверхность тестируемой подложки и фиксации в течение некоторого промежутка времени динамики изменения ее геометрии с помощью цифровой камеры установки “Фемтоскан Радиан” (ЦПТ, Россия).

Одновременно с помощью адаптированного программного обеспечения установки можно проводить измерения величины контактного угла смачивания в разные моменты времени. Результат исследования – изображения микрокапель в разные моменты времени, а также контактный угол смачивания.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что нативный перикард состоит из пучков волокон, между которыми содержатся пластинчатые отростки фиброцитов, а также ячейки и поры. В общем виде перикард представляет собой плотную неоформленную соединительную ткань, в которой коллагеновые волокна образуют неупорядоченную ячеистую сетку.

На рис. 1 изображена структура перикарда теленка после обработки аналогично ДЭП, отличающаяся от нативного перикарда лишь тем, что в отдельных ячейках заметны фрагменты фиброцитов, в основном их ядросодержащих зон.

На поверхности перикарда, стабилизированного по известной методике [10] глутаровым альдегидом в течение длительного времени, в основном обнаруживаются пластины фиброцитов и в небольшом количестве некоторые волокнистые образования. Толщина этих образований составляет

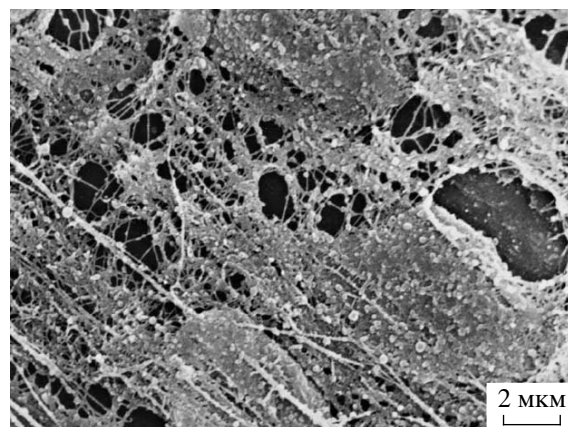


Рис. 1. Гистоархитектоника детергентно экстрагированного перикарда.

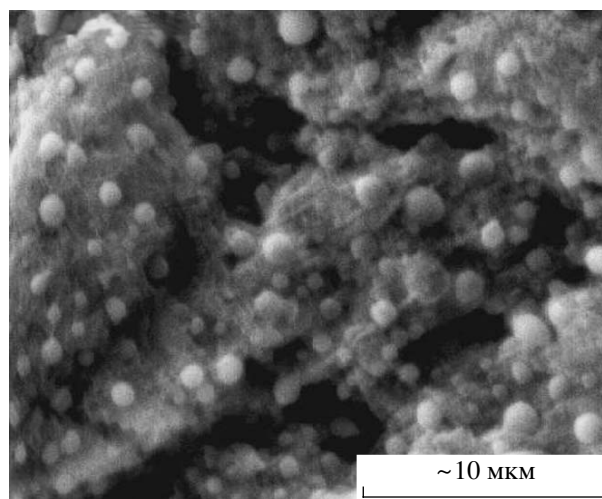


Рис. 2. Рельеф поверхности перикарда, модифицированного Си-хитозаном и ССХ (двуслойное покрытие).

0.2–0.5 мкм. Размеры пластин достигают 10–30 мкм, при этом размеры пор сильно варьируют и составляют 0.5–5.0 мкм.

При модификации поверхности перикарда последовательно Си-хитозаном и ССХ (рис. 2) на фоне образованной пленки обнаруживаются отдельные структурные элементы перикарда. Как видно, поверхность пленки покрыта сферическими частицами, размеры которых колеблются в довольно широком диапазоне: 0.3–2.0 мкм (на отдельных участках видны глобулы размером более 2 мкм). Подобные крупные образования в сравнении с наноразмерными частицами исходных растворов (менее 0.22 мкм), очевидно, являются следствием агрегации противоположно заряженных производных хитозана. При этом образующаяся пленка неравномерно покрывает поверхность биоткани, поэтому через ее отдельные ультратонкие участки видна исходная структура перикарда. На этих

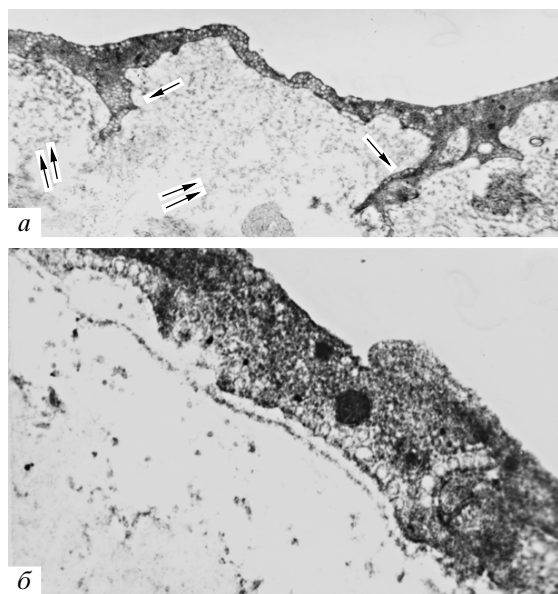


Рис. 3. Поперечный ультратонкий срез перикарда, модифицированного производными хитозана: *а* – однослойное покрытие ССХ, *б* – двуслойное покрытие Си-хитозаном и ССХ.

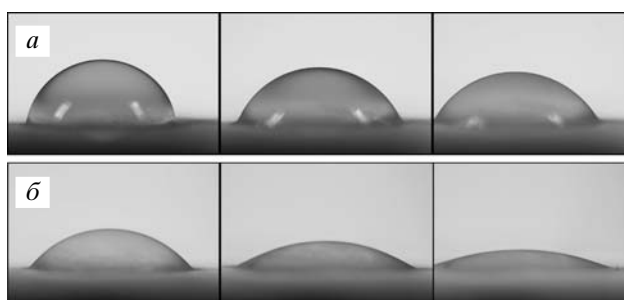


Рис. 4. Динамика изменения во времени морфологии капли воды на поверхности модифицированного перикарда: *а* – контрольный образец; *б* – двуслойное покрытие Си-хитозаном и ССХ. Справа налево: сразу после нанесения, спустя 100 с, спустя 200 с. Размер кадра: 4.5×3.0 мм.

участках мелкие сферические частицы хитозана, входящие в состав пленки, не выявляются, по-видимому, из-за недостаточного разрешения и контраста изображения СЭМ.

Для подтверждения вывода о непрерывном характере образованной пленки было проведено исследование поверхности модифицированного перикарда методом ПЭМ. На поперечных ультратонких срезах методом ПЭМ удастся визуализировать толщину однослойного покрытия ССХ на поверхности перикарда, которая составляет примерно 0.8 мкм (рис. 3а). При этом покрытие имеет неровный контур и большое количество пузырьков. На срезе перикарда видны отдельные поперечно срезанные коллагеновые волокна, отмеченные на рис. 3а

стрелками. В отдельных участках препаратов обнаружено проникновение молекул ССХ в поры структуры перикарда (отмечено стрелками), по всей вероятности, в ячейки сетки коллагеновых волокон или зоны, не закрытые телами фиброцитов.

В образцах с двуслойным покрытием перикард имеет более сглаженный рельеф. На срезе препарата (рис. 3б) структура покрытия выглядит неоднородной с большим количеством пустот, заметны волокнистые образования и затекание растворов производных хитозана в свободные от волокон коллагена поры ткани. Видно, что в данном случае имеет место более плотное покрытие поверхности перикарда, при этом рельеф поверхности имеет более сглаженный вид по сравнению с однослойным покрытием. Толщина двуслойного покрытия составляет примерно 3.5 мкм.

Таким образом, выявлено активное проникновение макромолекул производных хитозана в ячейки сетки коллагеновых волокон перикарда, где отсутствуют тела фиброцитов или фрагменты их ядросодержащих зон (рис. 3а, б). В результате данного процесса, сопровождающегося образованием полиэлектролитного комплекса, на поверхности стабилизированного глутаровым альдегидом перикарда формируется плотное покрытие, что существенно сглаживает его рельеф и, очевидно, видоизменяет физико-химические и биологические свойства покрытия.

Действительно, изменение физико-химических свойств надмолекулярной структуры покрытия подтверждается результатами исследования процесса смачивания капель воды поверхности исходного и модифицированного перикарда. На рис. 4 приведены макрофотографии капель воды в разные моменты контакта с немодифицированным и двуслойным покрытием перикарда. Модификация перикарда производными хитозана приводит к улучшению смачиваемости его поверхности водой и увеличению скорости сорбции воды в пористую структуру подложки по сравнению с немодифицированным перикардом. Уменьшение объема капли при мало меняющейся площади контактной области приводит к уменьшению значения контактного угла смачивания (от 70° – 80° для перикарда до 10° – 20° для модифицированного перикарда).

Процесс сорбции капли воды с начальным объемом 5 мкл пористым перикардом через область контакта площадью около 0.1 см^2 происходит примерно за 500 с, в то время как в случае двуслойного покрытия капля впитывается менее чем за 30 с, что свидетельствует о значительной скорости сорбционного потока. При этом скорость сорбционного потока почти на два порядка выше, чем для немодифицированного перикарда ($10^{-4} \text{ г} \cdot (\text{см}^2 \cdot \text{с})^{-1}$).

Таким образом, покрытие поверхности пористой структуры перикарда производными хитозана существенно ускоряет процесс впитывания воды в подложку и улучшает ее смачиваемость водой, что свидетельствует о большей гидрофильности покрытия по сравнению с немодифицированным перикардом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Роснауки (госконтракт № 02.513.11.3180, шифр 2007-3-1.3-22-02-047).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Серов В.В., Шехтер А.Б. // Соединительная ткань. М.: Медицина, 1981. 312 с.
2. Хэм А., Кормак Д. // Гистология. Т. 2. М.: Мир, 1983. С. 35.
3. Forti F.L., Goissis G., Plepis A. // J. Biomater. Appl. 2006. V. 20. P. 267.
4. Connolly J.M., Alferiev I., Kronsteiner A. et al. // J. Heart Valve Dis. 2004. V. 13. № 3. P. 487.
5. Clark J.N., Ogle M.F., Ashworth P. et al. // Ann. Thorac. Surg. 2005. V. 79. № 3. P. 897.
6. Vasudev S.C., Chandy T., Sharma C.P. // Biomaterials. 1997. V. 18. № 5. P. 375.
7. Vasudev S.C., Chandy T. // Drug Delivery. 1999. V. 6. P. 117.
8. Бокерия Л.А., Бакулева Н.П., Костава В.Т. и др. // Бюл. НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН "Сердечно-сосудистые заболевания". 2008. Т. 9. № 6. С. 25.
9. Галлямов М.О., Никитин Л.Н., Николаев А.Ю. и др. // Коллоид. журн. 2007. Т. 69. № 4. С. 448.
10. Мищенко Б.П., Зайцев В.В., Зайцев Л.В., Терещенкова И.А. Пат. РФ № 2120212 (20.10.1998).